

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Daisuke IGARASHI, et al.

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HERewith

FOR: METHOD FOR INCREASING GLUTAMATE CONTENT OF PLANTS AND THE PLANTS HAVING INCREASED GLUTAMATE CONTENT

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☒ Full benefit of the filing date of International Application PCT/JP02/06766, filed July 4, 2002, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e): Application No. Date Filed
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:


<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2001-208238	July 9, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.


Stephen G. Baxter

Registration No. 32,884

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

Vincent K. Shier, Ph.D.

Registration No. 50,552

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2001年 7月 9日

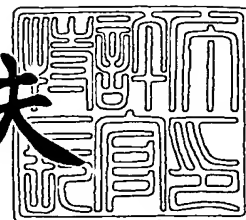
出願番号
Application Number: 特願2001-208238
[ST. 10/C]: [JP2001-208238]

出願人
Applicant(s): 味の素株式会社
財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

2003年10月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3082146

【書類名】 特許願

【整理番号】 Y1I0381

【提出日】 平成13年 7月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社
 中央研究所内

 【氏名】 五十嵐 大亮

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社
 中央研究所内

 【氏名】 大住 千栄子

【特許出願人】

 【識別番号】 000000066

 【氏名又は名称】 味の素株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 596175810

 【氏名又は名称】 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

【代理人】

 【識別番号】 100059959

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 中村 稔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100067013

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 大塚 文昭



【選任した代理人】

【識別番号】 100082005

【弁理士】

【氏名又は名称】 熊倉 禎男

【選任した代理人】

【識別番号】 100065189

【弁理士】

【氏名又は名称】 穴戸 嘉一

【選任した代理人】

【識別番号】 100096194

【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 英人

【選任した代理人】

【識別番号】 100074228

【弁理士】

【氏名又は名称】 今城 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100084009

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 信夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100082821

【弁理士】

【氏名又は名称】 村社 厚夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100086771

【弁理士】

【氏名又は名称】 西島 孝喜



【選任した代理人】

【識別番号】 100084663

【弁理士】

【氏名又は名称】 箱田 篤

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008604

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 植物のグルタミン酸含量を増加させる方法、および、グルタミン酸含量の増加した植物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性が欠失又は低下した植物。

【請求項 2】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性が欠失又は低下し、かつ、同条件で栽培された対応する野生型植物に比べてグルタミン酸含量が増加した、請求項 1 に記載の植物。

【請求項 3】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性が欠失又は低下し、かつ、同条件で栽培された対応する野生型植物に比べてグルタミン酸含量が1.2倍以上増加した、請求項 1 に記載の植物。

【請求項 4】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の機能が阻害されていることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の植物。

【請求項 5】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が破壊されていることを特徴とする請求項 4 に記載の植物。

【請求項 6】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の発現が抑制されていることを特徴とする請求項 4 に記載の植物。

【請求項 7】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性が、ペルオキシソームにおける活性であることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の植物。

【請求項 8】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性が光合成組織中のペルオキシソームにおける活性であることを特徴とする、請求項 7 に記載の植物。

【請求項 9】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質が、配列表配列番号 1 に記載の配列中 1 番目から478番目のア

ミノ酸配列を有するものであることを特徴とする請求項 4～6 のいずれか 1 項に記載の植物。

【請求項 10】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質が、配列表配列番号 1 記載の配列中 1 番目から 481 番目のアミノ酸配列を有するものであることを特徴とする請求項 4～6 のいずれか 1 項に記載の植物。

【請求項 11】 請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の植物の種子。

【請求項 12】 同条件で栽培された対応する野生型植物の種子に比べてグルタミン酸含量が増加した、請求項 11 に記載の種子。

【請求項 13】 同条件で栽培された対応する野生型植物の種子に比べてグルタミン酸含量が 1.2 倍以上増加した、請求項 11 に記載の種子。

【請求項 14】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を欠失又は低下させることを特徴とする、同条件で栽培された対応する野生型植物に比べて植物および／または種子中のグルタミン酸含量を増加させる方法。

【請求項 15】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の機能が阻害されることを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が破壊されていることを特徴とする、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の発現が抑制されることを特徴とする、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性がペルオキシソームにおける活性である、請求項 14～17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性が光合成組織中のペルオキシソームにおける活性であることを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質が、配列表配列番号 1 記載の配列中 1 番目から 478 番目のアミノ酸配列を有するものであることを特徴とする請求項 14～17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】 グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質が、配列表配列番号 1 記載の配列中 1 番目から 481 番目のアミノ酸配列を有するものであることを特徴とする請求項 14～17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】 請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の植物を栽培し、前記植物の種子を回収することを含む、同条件で栽培された植物から得られる種子に比べてグルタミン酸含量の増加した種子を製造する方法。

【請求項 23】 請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の植物の食品製造のための使用。

【請求項 24】 請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の植物を含む食品。

【請求項 25】 請求項 11～13 のいずれか 1 項に記載の種子の食品製造のための使用。

【請求項 26】 請求項 11～13 のいずれか 1 項に記載の種子を含む食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物および／または種子のグルタミン酸含量を増加させる方法、グルタミン酸含量が増加した植物および／または種子、および、グルタミン酸含量の増加した植物および／または種子の食品製造への使用、グルタミン酸含量の増加した植物および／または種子を含む食品に関する。

【0002】

【従来の技術】

グルタミン酸は一般にタンパク質中に広く存在し、トマト、ダイズ、アズキ、ソラマメ、インゲン、エンドウなどのうまみ成分やダイズ等から作られる醸造食

品のうまみ成分として知られている。グルタミン酸は高等植物のアミノ酸合成系の初期に合成され、アラニン、グリシン、セリン、プロリン、アルギニンといった主要アミノ酸のアミノ基供与体となる。種子では葉で合成されたグルタミン、アスパラギンは篩管を經由して運ばれ、グルタミン酸が合成された後に上記の主要アミノ酸の合成に使用される。グルタミンのアミノ基を転移する酵素群は植物中の各組織、例えば、種皮、胚嚢液、子葉等の区画された組織の中で厳密に制御された機能分担に基づいて機能していると考えられている。このようにグルタミン酸はタンパク質合成を含む生体内の種々の反応におけるアミノ基の供与体であり、多様かつ複雑な制御を受ける生合成経路で代謝されるため、植物体中で遊離グルタミン酸含量を増大させることは容易ではない。特にアミノ酸は主としてタンパク質として貯蔵されるため、特定のアミノ酸を遊離した形で増加させることは困難であると考えられている。実際、これまでグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の導入によってタバコやトウモロコシの根で遊離グルタミン酸含量が増加したという報告、あるいは、ダイズの葉においてリジン含量の多いタンパク質をコードする遺伝子を過剰発現させたときに種子において遊離リジンが蓄積した等の僅かの例が知られているのみである。

【0003】

グルタミン酸の代謝に関与する酵素の一つとしてアラニンアミノトランスフェラーゼが知られている。この酵素は、L-アラニンのアミノ基を2-オキソグルタル酸に転移させる反応およびその逆反応を触媒する酵素であって、上述したグルタミン酸代謝の一部を構成する酵素である。また、この酵素は、アラニンからグリオキシル酸、グルタミン酸からグリオキシル酸にアミノ基を転移し、グリシンを合成する反応を触媒する活性を有することが知られている (Biochem. J. 195:235-239, 1981)。一方、ペルオキシソーム中に存在するアラニンアミノトランスフェラーゼはグルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性、すなわち、グルタミン酸とグリオキシル酸を基質として α ケトグルタル酸とグリシンを合成する活性をも有する可能性が示唆されている (Noguchi T. と HAYASHI S., Biochem. J. 195-235-239 (1981), Orzechowskiら、Acta Biochem. Pol.: 447-457 (1999)、Orzechowskiら、Acta Physiol. Plant 21:331-334 (1999))。しかし

ながら、アラニンアミノトランスフェラーゼおよびグルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性が植物のグルタミン酸含量の増減にどのような役割を果たしているかは明らかにされておらず、アラニンアミノトランスフェラーゼまたはグルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質またはこれをコードする遺伝子を操作して、植物体または種子においてグルタミン酸含量を実際に増加させ得る可能性を示唆した報告はなされていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、植物および／またはその種子のグルタミン酸含量を増加させる方法、グルタミン酸含量が増加した植物および種子、グルタミン酸含量の増加した植物および／または種子の食品製造への使用およびグルタミン酸含量の増加した植物および／または種子を含む食品を提供することである。

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ (GGT) 活性を阻害することによって、植物および／またはその種子のグルタミン酸含量を増加させ得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、GGT活性を欠失又は低下させることを特徴とする植物および／または種子中のグルタミン酸含量増加方法、および、GGT活性が欠失又は低下し、特に、同条件で栽培された対応する野生型植物に比べてグルタミン酸含量の増加した植物および／または種子である。

より具体的には、本発明は、GGT活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の機能が阻害されていることを特徴とする、GGT活性を欠失又は低下させることを特徴とする、同条件で栽培された対応する野生型植物に比べて植物および／または種子中のグルタミン酸含量を増加させる方法、および、GGT活性が欠失又は低下した植物、より具体的には、GGT活性が欠失又は低下し、同条件で栽培された対応する野生型植物に比べてグルタミン酸含量の増加した植物および種子である。

【0005】

【発明の実施の形態】

本発明は、植物および／または種子においてグルタミン酸含量を増大させることを目的とする。この目的は、GGTの活性を欠失又は低下させることによって達成される。

本発明の一つの実施態様においては、GGTをコードする遺伝子の機能が阻害される。ここで「グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ（またはGGT）をコードする遺伝子の機能」とは、遺伝子の、野生型グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するグルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼを発現させる機能をいう。従って、「グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ（またはGGT）をコードする遺伝子の機能」が阻害される場合には、例えば、この遺伝自体が破壊される場合、この遺伝子の発現が転写または翻訳レベルで阻害された場合、この遺伝子が改変され、その結果発現されるタンパク質が野生型GGTの活性を有しない場合が含まれる。

GGTをコードする遺伝子の機能を阻害することによるGGT活性の欠失または低下は、例えば、GGT遺伝子を破壊する、または、その発現を抑制するための遺伝子構築物で植物を形質転換することによって達成することができる。

【0006】

本発明の目的は前述したように、GGTの活性を欠失または低下させることによって達成される。この酵素活性の欠失または低下は、転写レベル、翻訳レベル、タンパク質レベルのいずれにおいて起こっていてもよい。例えば、そのような植物は、生育条件を変化させて馴化させ、後述するような方法でGGT活性を測定し、その活性が低下した植物をスクリーニングすることによってもよい。また、そのような活性の欠失または低下は、植物ゲノム中のGGTをコードする遺伝子の改変または破壊によって生じさせることもできる。あるいは、アンチセンス、コサプレッションによってGGT活性の欠失又は低下を生じさせてもよい。特に、本発明においては、形質の安定性等の観点から、GGT遺伝子を破壊することが最も好ましい。そのような遺伝子破壊は、トランスポゾンの挿入、T-DNAの挿入、EMSなどの変異原処理による変異の導入などによって行なうことができる。トランスポゾン、T-DNAの挿入または変異原処理を用いた遺伝子破壊に関する一般的な技術

は当業者にはよく知られたものである。あるいは、作製された遺伝子破壊植物ライブラリーが入手できる場合は、それらのライブラリーに対して、GGT遺伝子破壊植物のスクリーニングを行なうことによって、目的とする形質転換植物を更に容易に得ることが出来る。そのようなライブラリーも商業的に入手可能である。

【0007】

本発明の植物は、同条件で生育させた野生型の植物と比較し、GGTの、総タンパク質に対する活性、新鮮質量に対する活性又は葉あたりの活性の少なくともいずれかが、発生のいずれかのステージにおいて約8割以下、好ましくは約5割以下、更に好ましくは3割以下に低下した植物である。

本発明のGGT活性の欠失または低下は、ペルオキシソーム、特に光合成組織のペルオキシソームにおいて生じることが好ましい。光合成組織は通常の培養あるいは栽培条件下で光合成を行なっている組織であればよく、たとえば、葉、茎、鞘その他が含まれる。

従って、本発明の方法によりグルタミン酸含量が増加した植物は、同条件で生育させた野生型の植物と比較し、好ましくは光合成組織から、特に好ましくは光合成組織のペルオキシソームから抽出した総タンパク質に対する活性、新鮮質量に対する前記組織又は細胞内器官のGGT活性又は葉あたりの前記組織又は細胞内器官のGGT活性が好ましくは約8割以下、好ましくは約5割以下、更に好ましくは約3割以下に低下した植物である。

【0008】

ここで、本明細書において「グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ」とは、一般にグルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をいい、略号「GGT」も併用される。「グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子」とは、グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードするいかなる核酸断片も含まれる。

【0009】

本発明で標的とするGGT遺伝子は植物体から取得することもできる。たとえば、GGT遺伝子は、データベース上でアラニンアミノトランスフェラーゼをキーワ

ードとして検索することにより、そのDNA塩基配列情報を得ることが可能である。配列情報をもとにRT-PCR、5'-RACE、3'-RACEを行い、全長cDNAを取得できる。また既知の配列情報をもとにcDNAライブラリーから適切なプローブを用いたハイブリダイゼーションによってスクリーニングし、取得することも可能である。このスクリーニングに用いるプローブはGGTのアミノ酸または塩基配列をもとに調製することが可能である。

本発明においては、前述したように、標的とするGGTはペルオキシソーム、特に光合成組織のペルオキシソームに局在することが好ましい。このようなペルオキシソームへの局在は、ペルオキシソーム局在タンパク質に特徴的なN末端配列あるいはC末端配列の存在によって推定することができる。更に、得られたGGT遺伝子に、GFPやGUSといったレポーター遺伝子を、ペルオキシソームへの局在性を保持するように融合させ、細胞内で発現させ、観察することで確認することもできる。あるいは、タグ付きのGGTを発現させ、特異的抗体を用いて局在性を確認してもよい。

【0010】

本発明の植物は、遺伝子破壊植物ライブラリー等が利用できる場合は、そのライブラリーに対して、GGT遺伝子破壊植物をスクリーニングすることによって得ることが出来る。これらの植物においてGGT遺伝子がどのように破壊されているかも、適切なプライマーおよびプローブを組み合わせる等により確認することが出来る。そのようなスクリーニング方法および解析手段は当業者にはよく知られたものであり、例えば「植物のゲノム研究プロトコル」（秀潤社）を参考にすることが出来る。そのようなライブラリーが入手できない場合であっても、トランスポゾンやT-DNA等を用いた遺伝子工学的手法により、そのような遺伝子破壊植物、特にGGT遺伝子が破壊された植物、あるいは、その他の原因によりGGT活性が欠失または阻害した植物を作製することができる。

本発明の一実施態様において遺伝子破壊植物を作製するために使用し得る核酸構築物は当業者によく知られた方法を使用して作製することができる。核酸構築物を設計および単離し、その配列を決定する方法を含む分子生物学的手段については例えば、Sambrookら、Molecular cloning-Laboratory manual, 第2版、Col

d Spring Harbor Laboratory Pressのような文献を参照することができる。あるいは、本発明に使用し得る核酸構築物を作成するためにPCR法を初めとする遺伝子増幅が必要になることもあるが、そのような手法についてはF.M. Ausubel et al. (eds), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)などを参照することができる。

また、植物における遺伝子破壊方法も一般に当業者に知られた方法を利用することができ、例えば、GGT遺伝子を標的として、トランスポゾンやT-DNAを利用してゲノム中の同遺伝子を破壊することが好ましい。このための適切な遺伝子構築物の設計は当業者には容易に理解できるであろう。トランスポゾンやT-DNAを用いた遺伝子破壊のための一般的な技術については、例えばPant molecular biology manual 2nd, S.B. Gelvin and R.A. Schilperを参照することが出来る。

【0011】

上述の実施態様において使用し得る核酸構築物導入法は特に限定されず、植物細胞あるいは植物体への遺伝子導入法として当業者に知られた方法を宿主に応じて選択することができる。例えば、アグロバクテリウムを用いた遺伝子導入法、エレクトロポレーション法、パーティクルガンを利用することができる。アグロバクテリウムを利用する場合は、移入される配列は左右のT-DNAボーダー配列の間に挿入されることが好ましい。このようなT-DNAをベースとする形質転換ベクターの適切な設計および構築は当業者によく知られたものである。また、そのような核酸構築物を有するアグロバクテリウムを特定の植物に感染させるための条件も当業者によく知られたものである。そのような技術および条件については、例えば、秀潤社、細胞工学別冊「モデル植物の実験プロトコル イネ・シロイヌナズナ編」(1996)等を参照することができる。

【0012】

遺伝的改変操作を行う植物種は特に限定されないが、栽培および形質転換が容易で植物体への再生系が確立している植物種が好ましい。本発明に適した植物は前述の特性を有するものの他、大量栽培技術の確立した植物種や食品としての利用価値の高い植物等がより好ましい。そのような植物には、モデル植物としてのシロイヌナズナの他に、イネ、ハウレンソウ、キャベツ、レタス、サラダナ、セ

ロリ、キュウリ、トマト、ソラマメ、ダイズ、アズキ、インゲン、エンドウ等が含まれる。

【0013】

次に上述のように遺伝的に操作された植物細胞等は、形質転換体について選抜される。この選抜は、例えば形質転換に使用した核酸構築物上に存在していたマーカー遺伝子の発現に基づいて行ってもよい。例えば、マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子である場合は、適当な濃度の抗生物質または除草剤等を含む培地上で操作された植物細胞等を培養または生育させることにより選抜することができる。あるいは、マーカー遺伝子が β -グルクロニダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などの場合はその活性についてスクリーニングすることにより形質転換体を選抜することができる。このようにして同定された形質転換体、例えば、プロトプラスト、カルス、外植片等から植物体への再生を行なうことができる。この再生には使用する宿主植物について当業者に知られた方法を利用することができる。このようにして得られた植物体は通常の方法、すなわち非形質転換体と同様の条件または、各形質転換体に適した条件で栽培してよく、本発明の核酸構築物を含む形質転換植物を同定するために前述のマーカー遺伝子に基づく選抜に加えて、種々の分子生物学的手法を利用することができる。特に、本発明のGGT活性が低下した植物は、生育阻害を生じさせないように、強光条件を避けることが好ましい。

標的遺伝子の破壊または組換えDNAインサートの有無およびその構造を検出するためには、サザンハイブリダイゼーション、PCR、ノーザンブロットおよびRT-PCRなどを利用することができる。

【0014】

次に、得られた形質転換植物は、GGTタンパク質量、GGT活性、およびGGTのmRNA量について評価することができる。例えばタンパク質の量はウエスタンブロット等の方法により、mRNA量はノーザンブロット、定量的RT-PCRなどの方法によって評価することができる。またGGT活性は、一般的な方法 (Plant Physiol. 99: 1520-1525) によって測定することができる。例えば、光合成組織におけるGGT活性を測定するには、まず、植物の葉等の光合成組織を液体窒素で凍結後粉碎し、

適当な抽出液、例えば、100mM Tris-HCl (pH7.3)、10mM DTTを含むバッファーに懸濁し、限外濾過をおこない、前述した方法 (Plant Physiol. 99:1520-1525) によって測定すればよい。ペルオキシソームに局在するGGT活性を測定するには、一般的な方法 (Plant Physiol 43:705-713, J. Biol. Chem. 243: 5179-5184m Plant physiol 49: 249-251等) に従って、ペルオキシソームを単離し、前述した方法によって測定すればよい。これらの方法はいずれも当業者にはよく知られたものである。

【 0 0 1 5 】

得られた植物は、植物体中のグルタミン酸含量について評価することができる。グルタミン酸含量は、例えば、植物体またはその一部破碎し、抽出液を通常のアミノ酸分析装置にかけることによって調べることができる。例えば、植物体またはその一部からなるサンプルに80% エタノールを500 μ l加え、細胞破碎機MM300 (QIAGEN)で破碎後、80℃で10分間処理することでアミノ酸を抽出できる。遠心分離後、減圧旋回を行い残ったサンプルを0.02 NのHClに溶かすことで分析サンプルを調製できる。0.22 μ mのフィルターを通すことで不純物を除去しアミノ酸分析にはアミノ酸アナライザーLS-8800 (HITACH)を用いアミノ酸含量を測定することができる。植物体中のグルタミン酸含量は、同条件で生育させた野生型の植物に対する、総アミノ酸含量に対するグルタミン酸含量、新鮮質量あたりのグルタミン酸含量または特定の組織、好ましくは光合成組織、例えば、葉あたりのグルタミン酸含量の増加割合等を指標として定量化し、場合により統計的に処理することができる。その結果、いずれか1以上の指標について、グルタミン酸含量の増加が統計的に有意であれば、例えば有意水準5%において統計的に有意であれば、同条件で生育させた野生型の植物に比較してグルタミン酸含量が有意に増加したと判断することができる。

【 0 0 1 6 】

本発明の方法により、植物体のグルタミン酸含量が、同条件で栽培された野生型植物に対して、総アミノ酸含量に対するグルタミン酸の割合にして約1.2以上、通常約1.2倍～約2.5倍、新鮮質量あたりのグルタミン酸含量にして約1.2倍以上、一般には約1.5倍～約3倍程度まで増加する。

【0017】

このようにして、グルタミン酸含量が増大した形質転換植物が同定されたならば、その形質が遺伝的に安定に保持されるか否かを調べることもできる。このためには通常の光条件下で植物体を栽培して種子を採取し、その後代における形質および分離を解析すればよい。通常の光条件下での生育阻害が顕著な場合は、弱い光条件、例えば、 $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度、または高濃度 CO_2 条件、例えば0.7% CO_2 条件で生育させ、通常の光条件下で栽培して形質を解析することが可能である。後代における導入核酸構築物の有無、その位置、その発現等は初代形質転換体と同様に解析することができる。

グルタミン酸含量の増大した形質転換植物は導入したゲノムに組み込まれた核酸構築物由来の配列に関して、あるいは、破壊された遺伝子に関して、ヘテロ接合の場合もホモ接合の場合もあり得るが、必要に応じて交配すること等によりヘテロ接合体もホモ接合体も導くことができる。ゲノムに組み込まれた核酸構築物由来の配列は後代においてメンデルの遺伝法則に従って分離する。従って、本発明の目的のためには、形質の安定性の観点からホモ接合植物を使用するのが好ましい。本発明の植物は、通常の栽培条件下で栽培することができるが、生育阻害が起こらない範囲内でできる限り強光下で栽培することが望ましい。

【0018】

本発明の種子を製造する場合には、ホモ接合体植物を栽培し、その種子を回収することが特に好ましい。ホモ接合体の選抜は、世代を繰り返し、注目している表現型について分離しなくなるまで、すなわち、全ての後代において注目している表現型が現れる株を選抜することによって行なうことができる。更に、PCRやサザン解析によってホモ接合体を選抜することも可能である。特に、トランスポゾンやT-DNAの挿入によって、本発明の目的を達成した場合には、そのような分子生物学的手法が有用である。

本発明の種子は、上述した方法で得られた、GGT活性が欠失または低下した植物、特に、更に、グルタミン酸含量の増加が確認された植物を通常の条件下で栽培し、その種子を回収することによって得ることが出来る。例えば、破壊されたGGT遺伝子についてホモ接合である植物を通常の条件下で栽培し、その種子を回

収することによって得ることが出来る。より好ましくは $30\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}\sim 70\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 程度の光条件下で本発明の植物を栽培し、その種子を回収することによって本発明の種子を得ることが出来る。本発明の種子は、植物体について上述した方法に準じてグルタミン酸含量を測定することにより、同条件で栽培された対応する野生型植物より得られる種子に比較してグルタミン酸含量が増加していることを確認することができる。

【0019】

本発明の植物および種子は、食品および食品材料として、対応する野生型植物と同様に利用することが出来る。従って、本発明の植物および種子は、そのまま、あるいは通常の調理法および加工法に従って食品として利用することができる。特に好ましい食品は、グルタミン酸によるうま味が高いことが好まれる食品であり、例えば、しょうゆ、味噌、トマトケチャップ、納豆、スープ、スナック菓子等が含まれる。

以下の実施例は、シロイヌナズナの遺伝子破壊植物ライブラリーをスクリーニングすることによって本発明の植物等を得る方法、および得られた植物および種子の特性を記載したものである。本発明の植物、その種子、および本発明の方法は、シロイヌナズナという特定の植物種に限定されないことは当業者には明らかであろう。

【0020】

【実施例】

実施例1. シロイヌナズナのGGT欠損株の取得

(1) 植物の培養

プレート上での培養の為の基本培地として、1% (w/v) sucrose、0.05% (w/v) ME S [2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸]、0.8% (w/v) agarを含むPNS (Mol. Gen. Genet. 204:430-434) またはMS (Physiol Plant 15:473-479) 無機塩類を用いた。ロックウール上での栽培では、PNS無機塩類のみを栄養源とした。

【0021】

(2) GGT欠損株のスクリーニングのためのプライマー作製

シロイヌナズナのアラニンアミノトランスフェラーゼ (AlaAT) 遺伝子の情報を

基にAlaAT遺伝子を取得した。AlaAT遺伝子は、GGT遺伝子でもある。

インターネット上に公開されているデータをもとにAlaATのコピー数および配列を予測しプライマーを作製した。Alanine aminotransferase および Arabidopsisをキーワードにデータ検索を行った結果、少なくともゲノム上に4コピー、アラニンアミノトランスフェラーゼと予想される遺伝子が存在することが分かった。各遺伝子のGenbank アクセッション番号はAC005292 (F26F24.16)、AC011663 (F5A18.24)、AC016529 (T10D10.20)、AC026479 (T13M22.3)であった。それぞれの遺伝子をAlaAT1、2、3 および 4と命名し、予想されるアミノ酸配列の比較を図1で示した。あわせてEST情報を調べた結果、4コピーのうちAlaAT1の発現量がいちばん高い事が予想され、遺伝子破壊の効果がもっとも顕著に現れることが期待された。そこでAlaAT1の配列をもとに遺伝子破壊株スクリーニングの為にPCRプライマーを作製した(表1)。これらのプライマーは、かずさDNA研究所が提供しているシステムに対応して設計されている。

【表 1】

表 1. 遺伝子破壊株スクリーニングの為にPCRプライマー

名称	配列*
AAT1 U	CTCTAGAACCGAACGTGACTCTCCAG (配列番号 2)
AAT1 L	CCATGATCTCCGGCATCTCATCTTC (配列番号 3)
AAT1 L2	ATCACAAATCAGGCACAAGGTTAGAC (配列番号 4)
AAT RTU	GGAGGGAAGAAGTGAGCTAGGGATTG (配列番号 5)
AAT RTL	CGCTCATCCTGGTATAT GTTCTGCTG (配列番号 6)
00 L	ATAACGCTGCGGACATCTAC (配列番号 7)
02 L	TTAGACAAGTATCTTTCGGATGTG (配列番号 8)
03 L	AACGCTGCGGACATCTACATTTTGTG (配列番号 9)
04 L	GTGGGTAAATTAAGAATTCAGTACATTAAA (配列番号 10)
05 L	AAGAAAATGCCGATACTTCATTGGC (配列番号 11)
06 L	AAGAAAATGCCGATACTTCATTGGC (配列番号 12)
00 R	TAGATCCGAAACTATCAGTG (配列番号 13)
02 R	ACGTGACTCCCTTTAATTCTCCGCTC (配列番号 14)
03 R	CCTAACTTTTGGTGTGATGATGCTG (配列番号 15)
04 R	TTCCCTAAATAATTCTCCGCTCATGATC (配列番号 16)
05 R	TTCCCTTAATTCTCCGCTCATGATC (配列番号 17)
06 R	TTCCCTTAATTCTCCGCTCATGATC (配列番号 18)
EF U	GTTTCACATCAACATTGTGGTCATTGG (配列番号 19)
EF L	GAGTACTTGGGGGTAGTGGCATCC (配列番号 20)

* 配列は通常の表記法に従って、5'→3'方向に記載した。

【0022】

(3) AlaAT破壊株の単離

かずさDNA研究所が提供しているシステムを利用し遺伝子破壊シロイヌナズナライブラリーに対してAlaATに関するスクリーニングを行った。スクリーニングは、植物細胞工学シリーズ14「植物のゲノム研究プロトコル」(秀潤社) 2-4-

cに書かれている手順に従って行なった。

1次スクリーニングでは遺伝子側のプライマーとして(AAT1U/AAT1L)を用い、タグプライマーには(00L/02L/03L/04L/05L/06L/00R/02R/03R/04R/05R/06R)をそれぞれ対応するプールにおいて用いた。使用したタグプライマー各プールとの関係は表2に示した。

【0023】

【表2】

表2. タグプライマー各プールとの関係

DNA プール			プール数	タグプライマー	
P0009	～	P0020	12	P00R	P00L
P0023	～	P0040	18		
P0202	～	P0204	3	P02R	P02L
P0301	～	P0302	2	P03R	P03L
P0401	～	P0403	3	P04R	P04L
P0501	～	P0508	8	P05R	P05L
P0601	～	P0608	8	P06R	P06L
計			54		

【0024】

ポリメラーゼはEX-taq (TAKARA) を用いた。反応液の組成は20 μ l中に約38.4 ng (約100pg x 384) 鋳型DNA、10pmolタグプライマー、10pmol遺伝子プライマー、2 μ l 10xバッファー、5nmol dNTP、0.5U Ex-taqとした。PCRのサイクルは94℃にて45秒、52℃にて45秒、72℃にて3分を1サイクルとして35サイクル行った。10 μ l PCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動により分離した。EtBr染色により増幅されたDNA断片を観察した。このゲルは変性液 (1.5M NaCl、0.5M NaOH) で20分間浸とうし変性させた後、中和液 [0.5M Tris-HCl(pH 8.0)、1.5M NaCl] 中で20分間浸とうし、20 x SSC(3M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム)を用いてメンブレン-HybondN+ (Amersham Pharmacia Biotech) にプロットした。プロット後、UV架橋でメンブレンにDNAを固定した。ハイブリダイゼーションおよび検出はAlkPhos

-Direct DNA detection kit(Amersham Pharmacia Biotech)を用い添付のプロトコールにしたがった。ハイブリダイゼーションは65℃で行った。プローブはAAT1U/AAT1Lを用い、ゲノムDNAを鋳型にPCRを行いその増幅断片をGFX PCR DNA and Gel Band purification kit (Amersham Pharmacia Biotech)で精製した。

【 0 0 2 5 】

1次スクリーニングでは384の独立したタグ挿入ラインから抽出したゲノムDNAのミックスを1プールとして、54プール (384 x 54 = 20736ライン) においてPCRを行った。増幅産物に対してサザン分析を行い目的産物が増幅されたかを確認した。1次スクリーニングでポジティブな結果が得られたプールP0035に関して2次スクリーニングを行った。2次スクリーニングのためのPCRのプライマーの組み合わせは、1次スクリーニングでポジティブな結果の得られた、AAT1U/00LとAAT1L/00Lとした。2次スクリーニングの結果、単一のライン8046においてAlaAT1タグが挿入されていたことが明らかになった。

【 0 0 2 6 】

(4) タグ挿入位置の決定

決定したタグ挿入ラインから抽出したDNAを鋳型に2組のプライマーセット(AAT1U/00L、 AAT1L/00L)でPCRを行い増幅した断片をpGEM T-easy vector (Promega)にクローニングした。配列決定にはDNAシーケンサーABI PRISM™ 377 DNA sequencer (PERKIN ELMER)を用いた。

タグは第6エクソンに16bpの欠失を伴って挿入されており、タグの挿入により176-GGTLV-180から176-AIQL(end)-180に置換されていることが明らかになった。決定されたタグ挿入位置と近傍の配列を図2に示した。

【 0 0 2 7 】

実施例 2. GGT欠損株の特性解析

(1) ホモ接合体の選抜

タグの挿入が確認されたラインのT2種子を10mg/lハイグロマイシンを含むMS培地上に播種した。3週後にロックウールに移植しロッゼット葉約5mm四方のサンプルからDNAを抽出した。抽出方法はLiの方法(Plant J. 8:457-463)に従った。ホモ接合体を同定するため、タグを挟むプライマー(AAT1U/AAT1L2)でPCRを行った

。PCRは変性94℃にて30秒、アニーリング57℃にて30秒、伸長を72℃にて60秒とし30サイクル行った。コントロールには野生型のゲノムDNAを鋳型として用いた。PCR産物の一部を電気泳動により1%アガロースゲルで分離した。ホモ接合体は35ラインのうち11ライン存在した(図3)。

【0028】

(2) GGT発現の検出

ホモ接合体が得られたラインについて、その後代を用いて遺伝子破壊が起こっているかをRT-PCRで確認した。ホモ接合体からの種子を10mg/lハイグロマイシンを含むMS培地上に播種し、すべての個体が耐性を示すことを確認した。播種後2週間の幼植物からISOGEN(ニッポンジーン)を用いて全RNAを抽出した。DNase処理後superscript II(GIBCO)を用いてオリゴdTプライマーから逆転写を行い、合成した1本鎖cDNAを鋳型としてタグを挟むプライマー(AAT1 RTU/ AAT1RTL)を用いてPCRを行った。PCRは変性を94℃にて30秒、アニーリングを57℃にて30秒、伸長を72℃にて60秒とし、28サイクル行った。コントロールにはEF1- α (EFU/EFL)を用いた。PCR産物の一部を電気泳動により1%アガロースゲルで分離した。タグ挿入ラインではAlaAT1の完全なmRNAは検出されなかった(図4)。この結果に基づき、このタグ挿入株をaat1-1と命名し、以後の解析に用いた。

【0029】

(3) タグ挿入株aat1-1に対する強光の影響

タグ挿入株aat1-1の種子を土に播種し、通常的光強度(およそ70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)にて、16時間明期、8時間暗期の条件で培養を行った。

前述の条件で得られた20個の芽生えの地上部を回収し、質量を測定する操作を3回繰り返して平均値をとった。その結果、通常的光強度では生育が顕著に阻害されたが、一方、弱光下(およそ30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)では生育に大きな差は見られなかった(表3)。この結果からaat1-1は光呼吸が不完全になった為に起こる光阻害を受けていることが示唆された。

【 0 0 3 0 】

【表 3】

表 3. 強光の影響

相 対 質 量		
光 強 度 ($\mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	対 照	aat1-1
30	1	0.89
100	1	0.34

【 0 0 3 1 】

(4) タグ挿入株aat1-1における酵素活性

酵素活性の測定の為、PNS培地に播種後2週間、 $70 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光条件下で生育させた幼植物からタンパク質を抽出した。新鮮質量約200mgの植物体を液体窒素で凍結後、乳鉢と乳棒を用いて組織を破碎した。抽出液[100mM Tris-HCl (pH7.3)、10mM DTT]を1ml加え、15,000 rpm で10 分間遠心分離を行い、不溶物を除去した。さらに3回同操作を繰り返した。脱塩処理は限外ろ過フィルターUFV5B GC00 (millipore)を用いて行った。10,000rpmで約45分遠心分離をおこない抽出液0.5mlを10倍に濃縮した。抽出液で10倍に希釈し、同操作を3回繰り返した。タンパク質濃度をProtein assay kit (Bio-Rad)を用いて測定した。最終濃度が2mg/ml素抽出液 となるように10%グリセロールを含む抽出液を加え、粗抽出液とし、これを以下の酵素活性測定に用いた。

【 0 0 3 2 】

Ala (アラニン) + α KG (α ケトグルタル酸) \rightarrow Glu(グルタミン酸) + Pyr(ピルビン酸)の反応活性はLDH (EC 1.1.1.27)によるNADHの酸化反応と共役させ、0. D. 340nmの変化量で測定した。反応は600 μ l反応液 [100mM Tris-HCl(pH7.3)、10 0mM Ala、0.11mMピリドキサル5-リン酸、0.11mM NADH、15mM α KG、80mM NH_4Cl , 1200U/l LDH (SIGMA L2375)]に対して10 mg粗抽出液を用いて行った。

Glu+Pyr \rightarrow Ala+ α KGおよびGlu+グリオキシル酸 \rightarrow グリシン (Gly) + α KGの活性測定はNAD+-GDH (EC 1.4.1.3)によるNADHの酸化反応と共役させ0. D. 340nmの変化により測定した。反応は600 μ l反応液 [100mM Tris-HCl(pH7.3)、100mM G lu、0.11mMピリドキサル5-リン酸、0.11mM NADH、15mM Pyr、1200U/l GDH (G250

1)]に対して10mg粗抽出液を用いて行った。グリオキシル酸をアミノ受容体とした反応では、同じ反応液でPyrをグリオキシル酸に置換して行った。

各反応の活性を図5に示した。aat1-1において、AlaATが触媒すると考えられる3つの反応すべてにおいてaat1-1では活性が減少していることが分かった。更に、グルタミン酸からグリオキシル酸へのアミノ基転移反応を触媒する活性、すなわち、GGT活性がaat1-1において顕著に低下していることが明らかになった。

従って、強光条件下での生育阻害と酵素活性測定の結果と併せて、生理的条件下において、AlaAT1は実際に光呼吸の経路であるグリコール酸経路の中のグリオキシル酸からグリシンを合成する反応（図6矢印）に大きく寄与していることが示された。

【0033】

(5) タグ挿入株aat1-1のアミノ酸分析

遊離アミノ酸含量を測定する為、PNS培地に播種後2週間、 $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光条件下で生育させた幼植物からアミノ酸を抽出した。新鮮質量約40mgの植物体を液体窒素で凍結させ、 -80°C で保存した。凍結サンプルに80%エタノールを500 μl 加え、細胞破碎機MM300(QIAGEN)で破碎後、 80°C で10分間処理することでアミノ酸を抽出した。15,000 rpmで10分間の遠心分離後上清を取り、沈殿に 80°C の80%エタノールを500 μl 加えて、十分攪拌した後に再び 80°C で10分間処理した。15,000 rpmで10分間遠心分離後の上清を取りアミノ酸抽出液とした。1mlのアミノ酸抽出液を減圧旋回にかけ、エタノールおよび水分を完全に除去した。残ったサンプルに0.02N HClを300 μl 加えボルテックス後に遠心分離を行い上清とった。0.22 μm のフィルターを通すことで不純物を除去し分析用のサンプルとした。アミノ酸分析はアミノ酸アナライザーLS-8800(HITACH)を用いて行った。主要なアミノ酸の含量(nmol/mg FW)および総アミノ酸に対する割合を図7に示した。分析の結果aat1-1ではグルタミン酸の蓄積量が増大していた（図7）。

<配列表フリーテキスト>

配列番号 2 ~ 2 0 : PCRプライマー

【0034】

実施例 3. タグ挿入株aat1-1の種子のアミノ酸含量の測定

(1) aat1-1植物体の栽培

タグ挿入株aat1-1および対照植物Col-0の種子をPNS個体培地上に播種し、16時間明期-8時間暗期、 $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光条件下で3週間栽培し、ロックウールに移植した。Col-0およびaat-1の植物体を植えたロックウールを同じトレイの上に置き、週に一度、PNS溶液を肥料として与えた。種子を回収し、デシケーター内で十分に乾燥させた後、アミノ酸分析を行なった。

【0035】

(2) aat1-1種子のアミノ酸分析

乾燥種子およそ10mgと500 μl の80%エタノールを2mlチューブに入れ、細胞破砕機MM300(QIAGEN)を用いて完全に種子を破砕した。80℃で10分間してアミノ酸を抽出した。15,000rpmで10分間の遠心分離後、上清を除去し、沈殿に80%エタノールを500 μl 加えて充分攪拌後、再度80℃にて10分間処理した。15,000rpmにて10分間の遠心分離後、上清をアミノ酸抽出液サンプルとした。

1mlのアミノ酸抽出液サンプルを減圧旋回にかけ、エタノールと水分を完全に除去した。乾固したサンプルに500 μl の滅菌水と500 μl のジエチルエーテルを加え、充分に攪拌した。15,000rpmで5分間の遠心分離後、上層のエーテル相を除去した。水相部分を減圧旋回にかけ、水分を完全に除去した。乾固したサンプルに300 μl の0.02N HClを加え、ボルテックス後に遠心分離を行ない、上清を回収した。この上清を0.22 μm のフィルターを通して不溶物を除去し、アミノ酸分析用サンプルとした。アミノ酸分析はアミノ酸アナライザーLS-8800(HITACHI)を用いて行なった。主要なアミノ酸の含量 (nmol/mg FW) および総アミノ酸に対する割合 (%) をそれぞれ図8および図9に示した。

いずれの結果も、種子におけるグルタミン酸含量の増加を示している。

【発明の効果】

本発明により植物および／またはその種子のグルタミン酸含量を増加させることができ、グルタミン酸含量の増大した植物および／または種子を得ることができる。従って、本発明により、ハウレンソウ、キャベツ、レタス、トマトのように植物体や果実全体を食する植物のグルタミン酸含量、およびダイズ、アズキ、

ソラマメ、インゲン、エンドウなどのように種子を直接食する植物においてその種子のグルタミン酸含量を増大させることが可能となるため、これらの植物および／または種子のうま味を向上させることが出来る。また、これらの植物体や種子を用いた食品のうま味の向上を図ることも出来る。

【 0 0 3 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Method of increasing the glutamic acid content in
plants, plants having increased glutamic acid content and their
seeds

<130> Y1I0381

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 481

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Ala Leu Lys Ala Leu Asp Tyr Asp Thr Leu Asn Glu Asn Val Lys
1 5 10 15

Lys Cys Gln Tyr Ala Val Arg Gly Glu Leu Tyr Leu Arg Ala Ser Glu
20 25 30

Leu Gln Lys Glu Gly Lys Lys Val Ile Phe Thr Asn Val Gly Asn Pro
35 40 45

His Ala Leu Gly Gln Lys Pro Leu Thr Phe Pro Arg Gln Val Val Ala
50 55 60

Leu Cys Gln Ala Pro Phe Leu Leu Asp Asp Pro Asn Val Gly Met Leu
65 70 75 80

Phe Pro Ala Asp Ala Ile Ala Arg Ala Lys His Tyr Leu Ser Leu Thr
85 90 95

Ser Gly Gly Leu Gly Ala Tyr Ser Asp Ser Arg Gly Leu Pro Gly Val
100 105 110

Arg Lys Glu Val Ala Glu Phe Ile Gln Arg Arg Asp Gly Tyr Pro Ser
115 120 125

Asp Pro Glu Leu Ile Phe Leu Thr Asp Gly Ala Ser Lys Gly Val Met
130 135 140

Gln Ile Leu Asn Cys Val Ile Arg Gly Asn Gly Asp Gly Ile Leu Val
145 150 155 160

Pro Val Pro Gln Tyr Pro Leu Tyr Ser Ala Thr Ile Ser Leu Leu Gly
165 170 175

Gly Thr Leu Val Pro Tyr Tyr Leu Asp Glu Ser Glu Asn Trp Gly Leu
180 185 190

Asp Val Ala Asn Leu Arg Gln Ser Val Ala Gln Ala Arg Ser Gln Gly
195 200 205

Ile Thr Val Arg Ala Met Val Ile Ile Asn Pro Gly Asn Pro Thr Gly
210 215 220

Gln Cys Leu Ser Glu Ala Asn Ile Arg Glu Ile Leu Lys Phe Cys Tyr
225 230 235 240

Asn Glu Lys Leu Val Leu Leu Gly Asp Glu Val Tyr Gln Gln Asn Ile
245 250 255

Tyr Gln Asp Glu Arg Pro Phe Ile Ser Ser Lys Lys Val Leu Met Glu
260 265 270

Met Gly Ser Pro Phe Ser Lys Glu Val Gln Leu Val Ser Phe His Thr
275 280 285

Val Ser Lys Gly Tyr Trp Gly Glu Cys Gly Gln Arg Gly Gly Tyr Phe
290 295 300

Glu Met Thr Asn Leu Pro Pro Arg Val Val Glu Glu Ile Tyr Lys Val

Asn Asp Glu Phe Met Thr Gln Tyr Asp Asn Asn Phe Gly Tyr Ser Lys

465

470

475

480

Met

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 2

ctctagaacc gaacgtgact ctccag

26

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 3

ccatgatctc cggcatctca tcttc

25

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 4

atcacaaatc aggcacaagg ttagac

26

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 5

ggaggggaaga agtgagctag ggattg

26

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 6

cgctcatcct ggtatatgtt ctgctg

26

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 7

ataacgctgc ggacatctac

20

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 8

ttagacaagt atctttcgga tgtg

24

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 9

aacgctgcgg acatctacat ttttg

25

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 10

gtgggttaat taagaattca gtacattaaa

30

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 11

aagaaaatgc cgatacttca ttggc

25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 12

aagaaaatgc cgatacttca ttggc

25

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 13

tagatccgaa actatcagtg

20

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 14

acgtgactcc ctttaattct ccgctc

26

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 15

cctaactttt ggtgtgatga tgctg

25

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 16

ttcccttaat tctccgctca tgatc

25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 17

ttcccttaat tctccgctca tgatc

25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 18

ttcccttaat tctccgctca tgatc

25

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 19

gtttcacatc aacattgtgg tcattgg

27

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 20

gagtacttgg gggtagtggc atcc

24

【図面の簡単な説明】

【図 1】

シロイヌナズナ由来アラニンアミノトランスフェラーゼ (AlaAT: GGTと同じ) のアミノ酸配列の比較。全てのアミノ酸が同一である箇所はアスタリスクで示した。

【図 2】

タグ挿入位置を示す。(A) AlaAT1のゲノム構造の模式図とタグ挿入位置。エキソンはボックスで、イントロンは線で示した。(B) 野生型(WT)の塩基配列とそのアミノ酸配列を上段に示し、8046位の近傍にT-DNAが挿入されたDNAの塩基配列とそのアミノ酸配列を下段に示す。T-DNAの挿入により置換された領域をボックスで示す。

【図 3】

(A) ホモ接合体の選抜に使用したプライマーの位置を示した図である。(B) ホモ接合体とヘテロ接合体の分離比を表す。

【図 4】

RT-PCRによるmRNAレベルのAAT1遺伝子発現を調べた図である。WT: 野生型株、8046: ホモ接合型AlaAT1タグ挿入株。

【図 5】

タグ挿入株aat1-1における酵素活性を示した図である。Ala+ α KG、Glu+Pyr、Glu+glyoxylateは、それぞれ、Ala+ α KG \rightarrow Glu+Pyr、Glu+Pyr \rightarrow Ala+ α KGおよびGlu+グリオキシル酸 \rightarrow Gly+ α KGの反応を触媒する活性を意味する。活性はNADHの酸化反応と共役させ、1 μ gのタンパク質および1分間あたりの340nmにおける吸光度変化 (ΔA) として表示した。

【図 6】

高等植物における光呼吸経路の模式図。グルタミングリオキシル酸アミノトランスフェラーゼが触媒する反応を矢印で示した。

【図 7】

1% sucroseを含むPNS培地上で2週間生育させた幼植物のアミノ酸含量。A：新鮮質量に対するアミノ酸含量、B：全アミノ酸に対する割合。対照：野生型植物、aat1-1：AlaT1タグ挿入植物系統8046。

【図 8】

aat1-1の種子におけるアミノ酸組成(nmol/mg FW)。

【図 9】

aat1-1の種子における相対アミノ酸組成(%)。

【書類名】

図面

【図 1】

```

AlaAT1 1:----- 0
AlaAT2 1:----- 0
AlaAT3 1:MRRFLINQAKGLVDHS-RRQ-HHHKSPSFLSPQRPPLASSPPALSRFF--SSTSEMSASD 56
AlaAT4 1:MRRFVIGQAKNLIDQSRRLQLHHHKNLSFVSLIP-PFSAPSDSSSRHLSSSSSSDMSASD 59

AlaAT1 1:-MAI.KAIDYDTI.NENVKKCQYAVRGE-LYL--R-ASEL--QKEG---KKVIFTNVGNPHA 50
AlaAT2 1:-MSLKALDYESLNENVKNCQYAVRGE-LYL--R-ASEL--QKEG---KKIIFTNVGNPHA 50
AlaAT3 57:STSSLPVTLDSINPKVLKCEYAVRGEIVNIAQKLQEDLKTNKDAYPFDEIITYCNIGNPQS 116
AlaAT4 60:SSSLPVTLDITNPKVIKCEYAVRGEIVNIAQKLQEDLKTNKDAYPFDEIITYCNIGNPQS 119
      * * * * * * * * * *

AlaAT1 51:LGQKPLTFPRQVVALCQAPFLDDPNV-GM-LFPADAIARAKHYLSLTSG-GLGAYSDSR 107
AlaAT2 51:LGQKPLTFPRQVVALCQAPFLDDPNV-GM-LFPADAIARAKHYLSLTSG-GLGAYSDSR 107
AlaAT3 117:LGQLPIKFFREVLALCDHASLLDESETHGL--FSTD SIDRAWRI LDHIPGRATGAYSHSQ 174
AlaAT4 120:LGQPIITFFREVLALCSYTALLDESATHGLFRFSSDSIERAWKILDQIPGRATGAYSHSQ 179
      *** * * * * * * * * * *

AlaAT1 108:GLPGVRKEVAEFIQRDGYPSDPELIFLTDGASKGVMQILNCVIRGNGDGILVPVPQYPL 167
AlaAT2 108:GLPGVRKEVAEFIERRDGYPSDPELIFLTDGASKGVMQILNCVIRGQKDGILVPVPQYPL 167
AlaAT3 175:GIKGLRDVIAAGIEARDGFADPNDFLTDGASPAVHMMQLLLSSEKDGILSPIQYPL 234
AlaAT4 180:GIKGLRDAIADGIEARDGFADPNDFMTDGASPGVHMMQLITSEKDGILCPIQYPL 239
      * * * * * * * * * *

AlaAT1 168:YSATISLLGGTLVPYYLDESENWGLDVANLRQSVAAQARSQGITVRAMVI INPGNPTGQCL 227
AlaAT2 168:YSATISLLGGTLVPYYLESENWGLDVNLRQSVAAQARSQGITVRAMVI INPGNPTGQCL 227
AlaAT3 235:YSASIALHGGSLVPYYLDEATGWGLEISDLKKQLEEARSKGISVRALV INPGNPTGQVL 294
AlaAT4 240:YSASIALHGGTLVPYYLDEASGWGLEISELKKQLEDARSKGITVRALV INPGNPTGQVL 299
      *** * * * * * * * * * *

AlaAT1 228:SEANIREILKFCYNEKLVLGDEVYQQNIYQDERPFISSKKVLMEMGSPFSKEVQLVSFH 287
AlaAT2 228:SEANIREILRFCCDERLVLGDEVYQQNIYQDERPFISSKKVLMMDGAPISKEVQLVSFH 287
AlaAT3 295:AEENQRDIYNFCKQEGVLVLADEVYQENVYVPDKKFHSFKKVARSLGY-GEKDLSLVSFQ 353
AlaAT4 300:SEENQRDVVKFCKQEGVLVLADEVYQENVYVPDKKFHSFKKVARSMGY-GEKDLALVSFQ 358
      * * * * * * * * * *

AlaAT1 288:TVSKGYWGECCQRGGYFEMTNLPPRVVEIYKVASIALSPNVSAQIFMGLMVNPPKPGDI 347
AlaAT2 288:TVSKGYWGECCQRGGYFEMTNIPRTVEIYKVASIALSPNVSAQIFMGLMVSPKPGDI 347
AlaAT3 354:SVSKGYWGECCQRGGYMEVTGFTSDVREIYKMASVNLCSNISGQILASLVMSPKPGDD 413
AlaAT4 359:SVSKGYWGECCQRGGYMEVTGFTSDVREIYKMASVNLCSNISGQILASLIMSPKPGDD 418
      ***** * * * * *

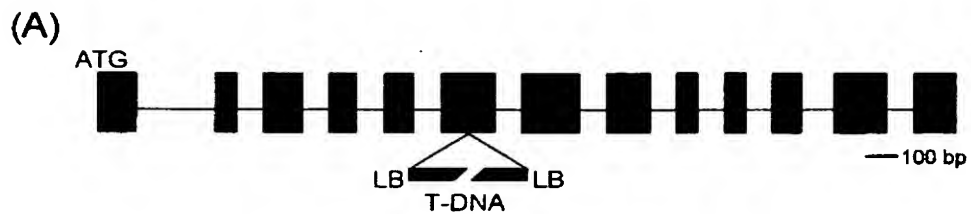
AlaAT1 348:SYDQFARESKGILESLRRRLMTDGFNSCKNVVCFTEGAMYSFPQIRLPTGALQAAKQ 407
AlaAT2 348:SYDQFVRESKGILESLRRRLRMMDTGFNSCKNVVCFTEGAMYSFPQIKLPSKAIQAAKQ 407
AlaAT3 414:SYDSYMAERDGI LSSMAKRAKTLEDALNSLEGVTCNRAEGAMYLFPRLNLPQKAI EAAEA 473
AlaAT4 419:SYESYIAEKDGI LSSLARRAKTLEEALNKLEGVTCNRAEGAMYLFPCLHLPQKAI EAAEA 478
      ** * * * * *

AlaAT1 408:AGKVPDVFYCLKI.I.EATGISTVPGSGFGQKEGVFHI.RTTI.LPAEDEMPEIMDSFKKFNDE 467
AlaAT2 408:AGKVPDVFYCLKLEATGISTVPGSGFGQKEGVFHLRTTILPAEEEMPEIMDSFKKFNDE 467
AlaAT3 474:EKTAPDAFYCKRI.I.NATGVVVVPGSGFGVPGTWHFRCTILPQEDKIPAIVNRLTEFHKS 533
AlaAT4 479:EKTAPDNFYCKRLLKATGIVVVVPGSGFRVPGTWHFRCTILPQEDKIPAIVDRLTA FHQS 538
      ** *** * * * * *

AlaAT1 468:FMTQYDNNFGYSKM 481
AlaAT2 468:FMSQYADNFGYSRM 481
AlaAT3 534:FMDEFNR----- 540
AlaAT4 539:FMDEFRD----- 545
      **

```

【図 2】



(B)

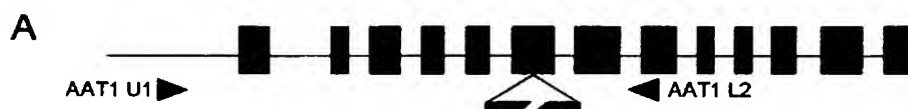
wild

CTG TTA GGT GGT ACT CTT GTT CTT TAC TAT CTT GAT GAG
 L L G G T L V P Y Y L D E

8046

CTG TTA GCA ATT CAA TTG TAA [T-DNA] GGTAATT TAC TAT CTT GAT GAG
 L L A I Q L * *

【図 3】

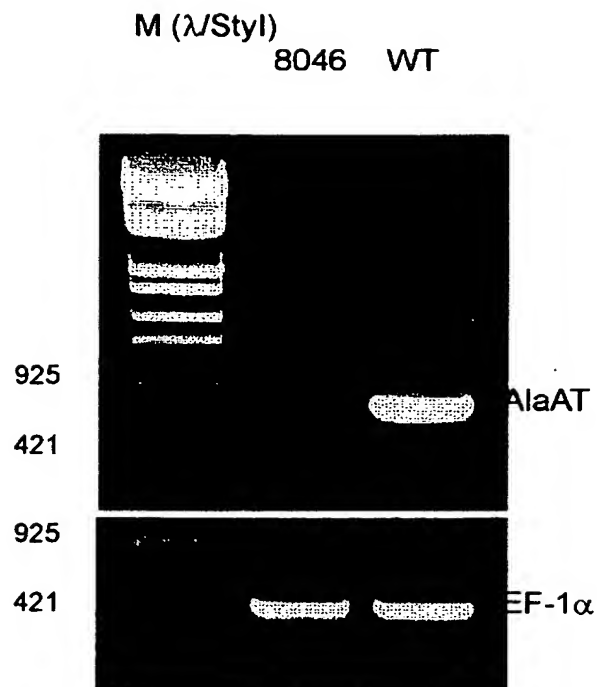


B

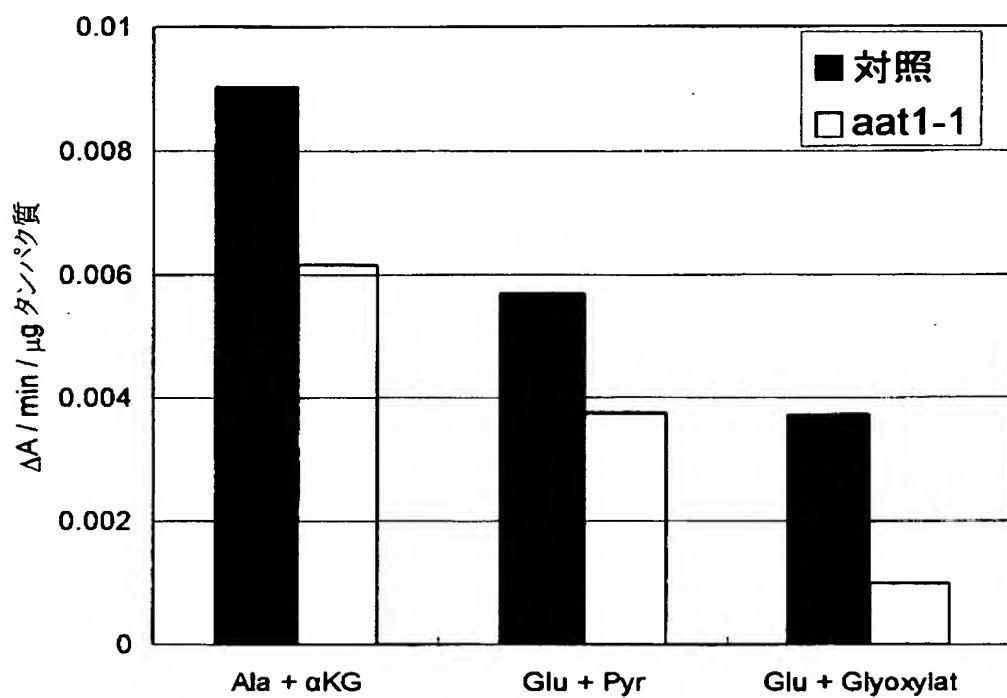
増幅(ヘテロ)	24
増幅せず(ホモ)	11

BEST AVAILABLE COPY

【図 4】

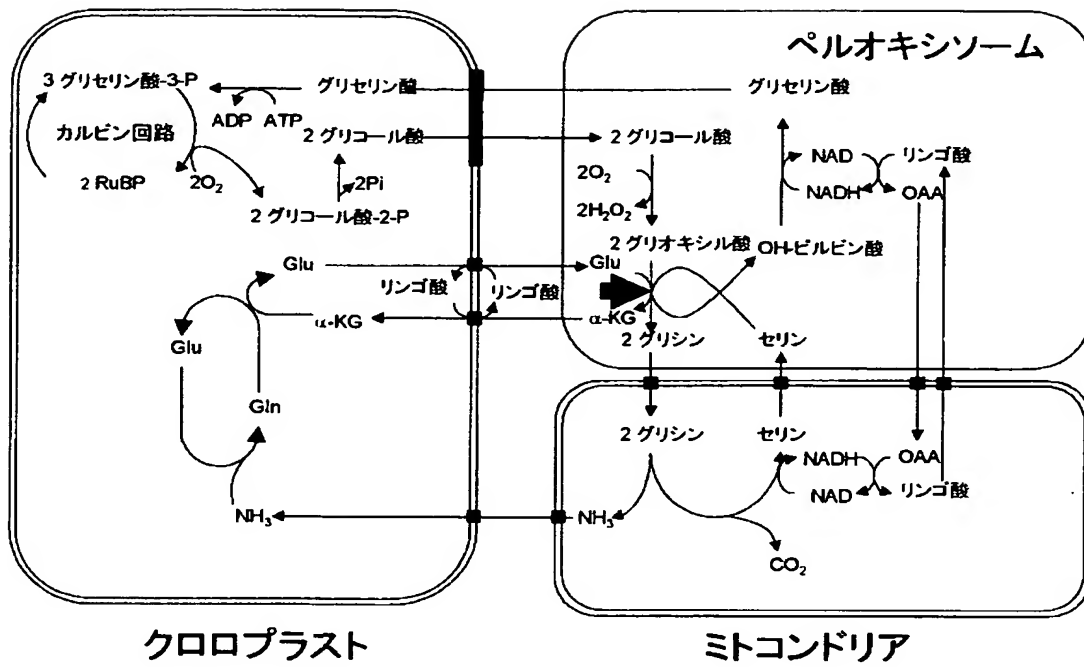


【図 5】



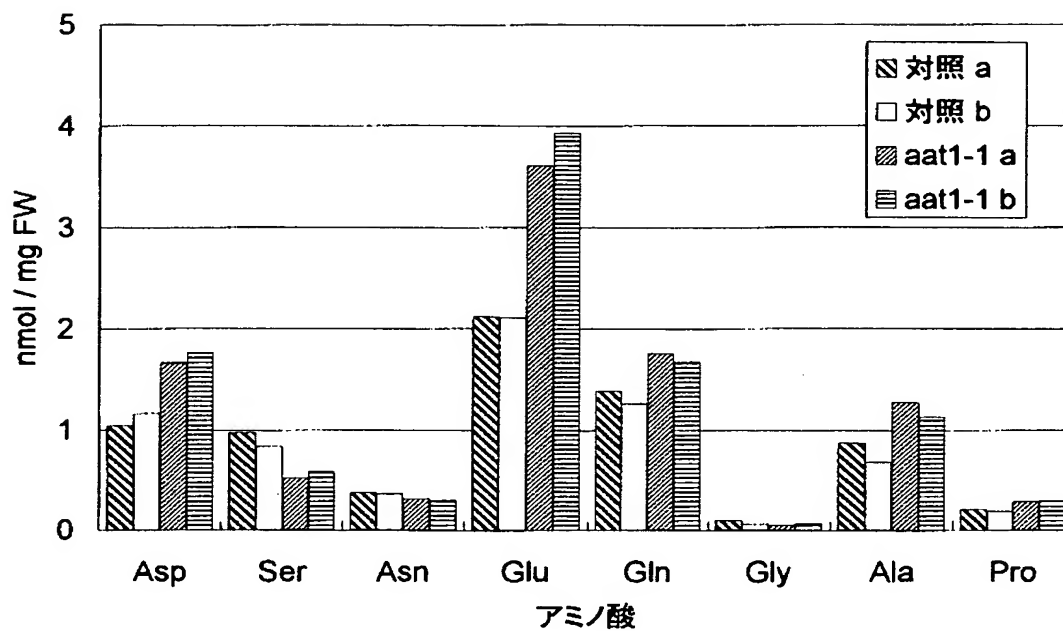
BEST AVAILABLE COPY

【図 6】

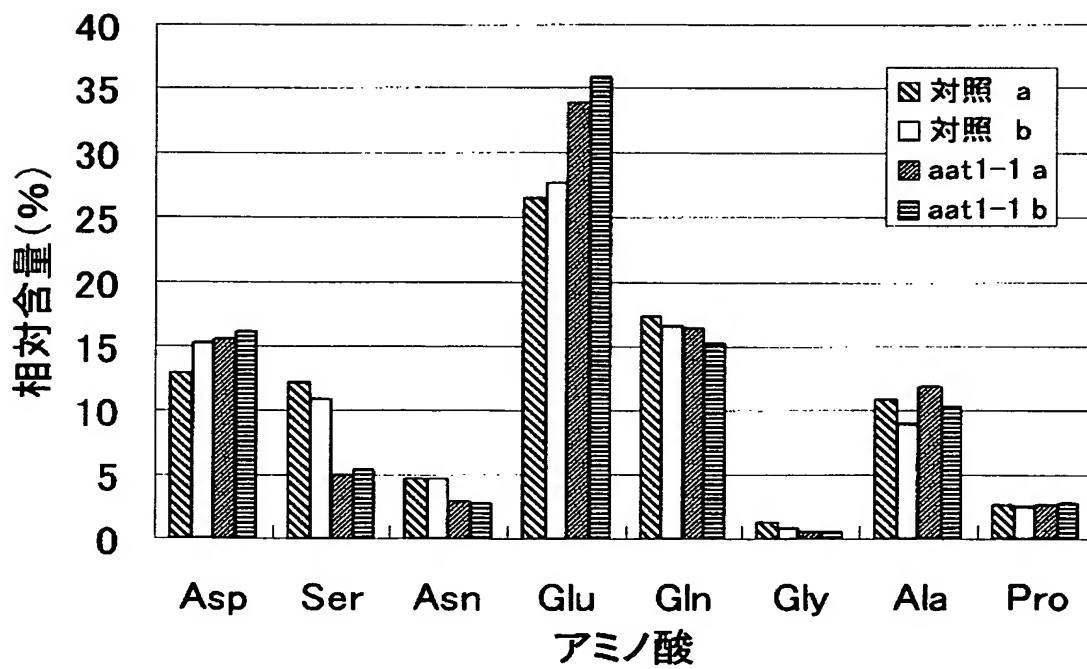


【図 7】

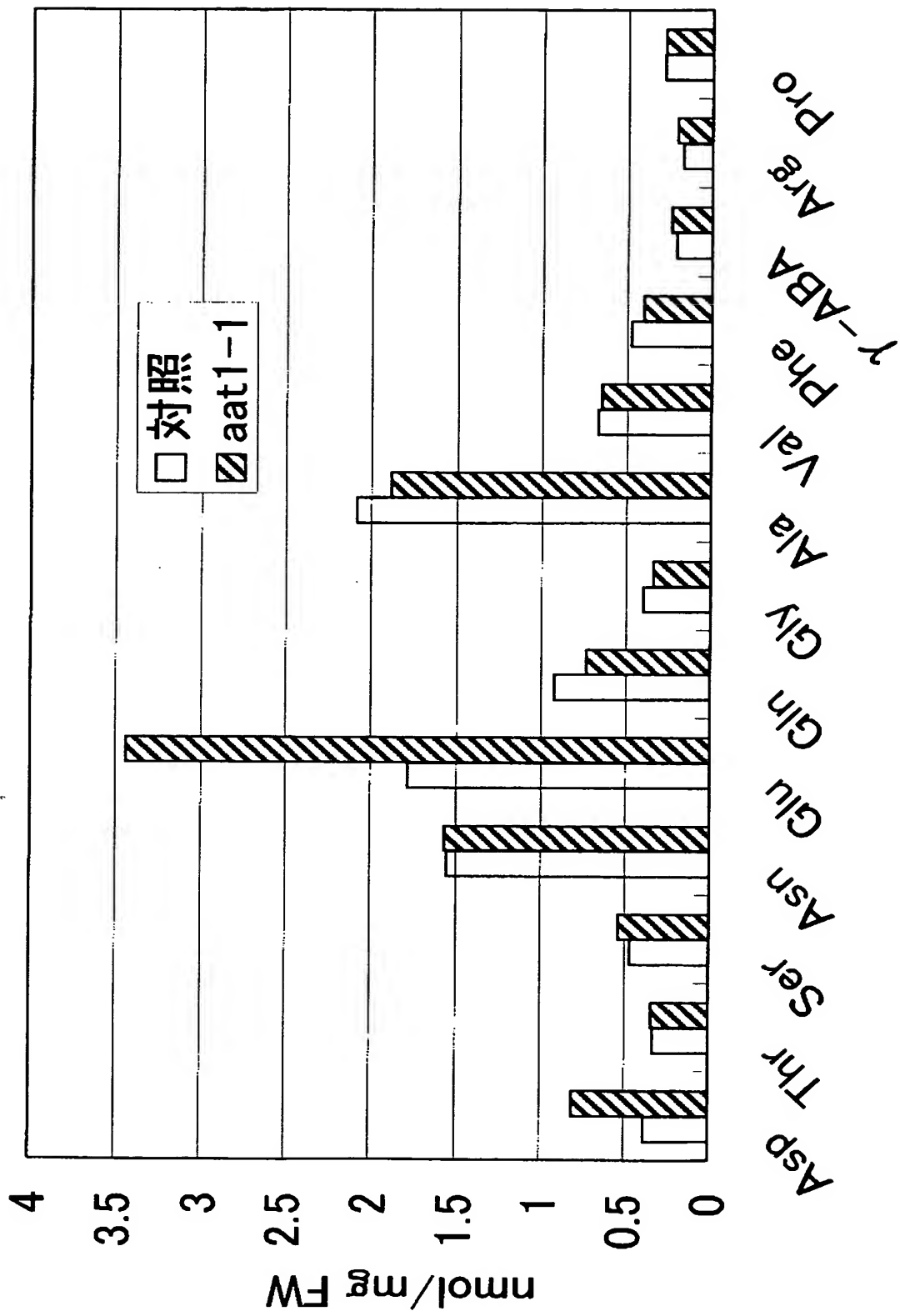
(A)



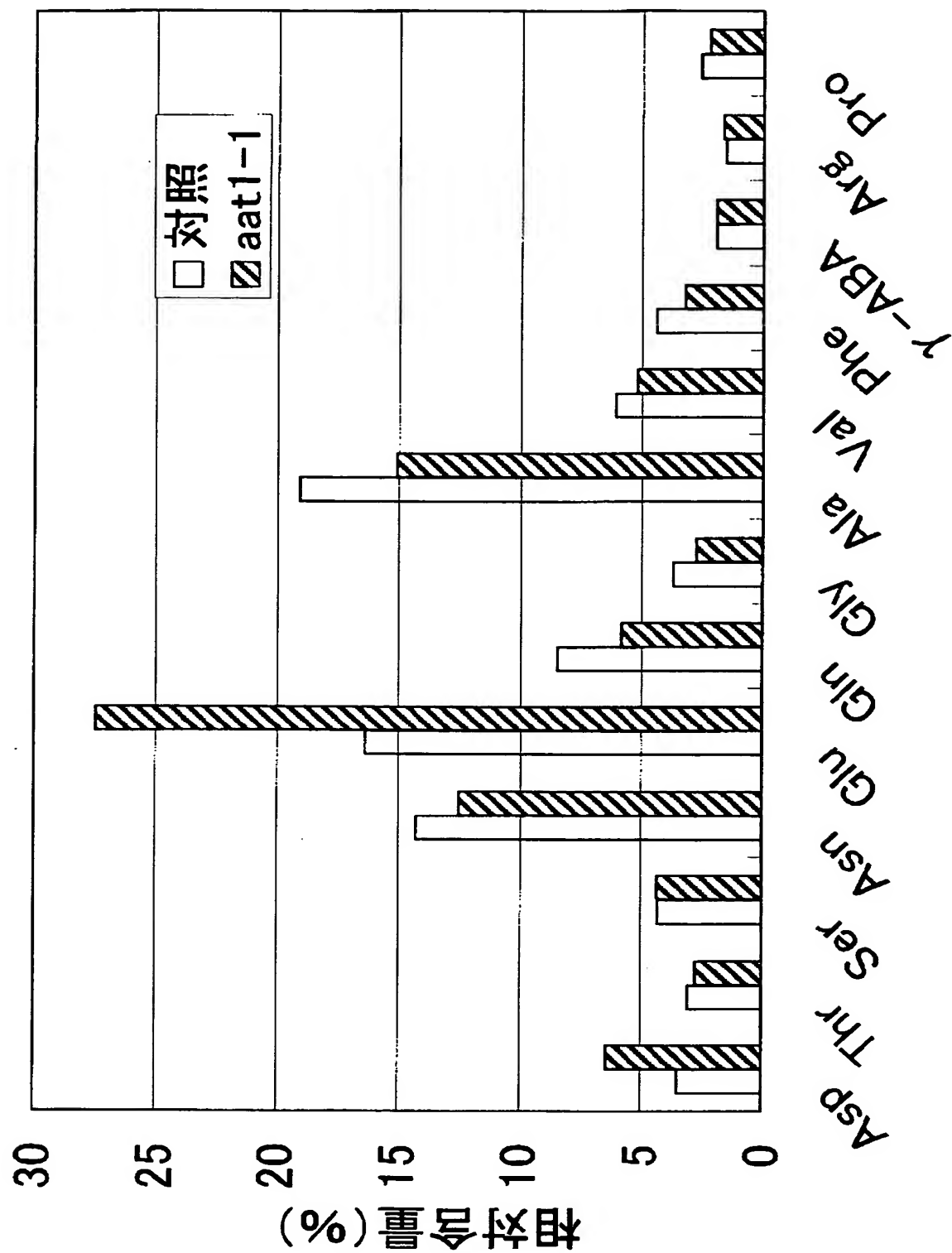
(B)



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 植物および／またはその種子のグルタミン酸含量を増加させる方法、グルタミン酸含量が増加した植物および種子、グルタミン酸含量の増加した植物および／または種子の食品製造への使用およびグルタミン酸含量の増加した植物および／または種子を含む食品を提供すること。

【解決手段】 GGT活性を欠失又は低下させることを特徴とする植物および／または種子中のグルタミン酸含量増加方法、および、GGT活性が欠失又は低下し、特に、同条件で栽培された対応する野生型植物に比べてグルタミン酸含量の増加した植物および／または種子。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 1 - 2 0 8 2 3 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 0 6 6]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 7 月 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号

氏 名

味の素株式会社

特願 2 0 0 1 - 2 0 8 2 3 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 6 1 7 5 8 1 0]

1. 変更年月日 1 9 9 6 年 1 2 月 5 日
 [変更理由] 新規登録
 住 所 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 - 3
 氏 名 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

2. 変更年月日 2 0 0 2 年 6 月 1 3 日
 [変更理由] 住所変更
 住 所 千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 6 - 7
 氏 名 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所